

PRIORITY DOCUMENT



REC'D 15 OCT 1998

WIPO PCT

## Bescheinigung

Die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften eV in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen"

am 7. August 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. August 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Faust

Aktenzeichen: 197 34 218.3

# VOSSIUS & PARTNER

Gesellschaft bürgerlichen Rechts

PATENTANWÄLTE

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

SIEBERTSTRASSE 4 · 81675 MÜNCHEN

PHONE (089) 474075 · TELEK 529453 VOPAT D · TELEFAX (089) 4706053-56, (089) 41900359 (G4)

u.Z.: A 2968 DE

I.Z.: GI-Nr. 2201

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.  
D-Berlin, BRD

## Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen, rekombinante Nucleinsäuremoleküle, die bei diesen Verfahren eingesetzt werden, deren Verwendung, sowie die Pflanzen, die eine Ertragssteigerung aufweisen.

Auf dem Gebiet der Agrar- und Forstwirtschaft ist man stetig darum bemüht, Pflanzen mit erhöhtem Ertrag zur Verfügung zu stellen, insbesondere um die Ernährung der fortwährend anwachsenden Weltbevölkerung sicherzustellen und die Versorgung mit nachwachsenden Rohstoffen zu gewährleisten. Traditionell wird versucht, ertragreiche Pflanzen durch Züchtung zu erhalten. Dieses ist jedoch zeit- und arbeitsintensiv. Ferner müssen entsprechende Züchtungsprogramme für jede interessierende Pflanzenart durchgeführt werden.

Fortschritte wurden zum Teil bereits durch die genetische Manipulation von Pflanzen erzielt, d.h. durch die gezielte Einführung und Expression von rekombinanten Nucleinsäuremolekülen in Pflanzen. Derartige Ansätze haben den Vorteil, daß sie in der Regel nicht auf eine Pflanzenart beschränkt sind, sondern sich auch auf andere Pflanzenarten übertragen lassen.

1 So wurde beispielsweise in EP-A 0 511 979 beschrieben, daß  
die Expression einer prokaryontischen Asparagin-Synthetase  
in Pflanzenzellen unter anderem zu einer erhöhten Biomasse-  
produktion führt.

5 Die WO 96/21737 beschreibt z.B. die Ertragssteigerung in  
Pflanzen durch Expression von de- oder unregulierter Fruc-  
tose-1,6-bisphosphatase, aufgrund der Erhöhung der Photosyn-  
thaserate.

10 Trotzdem besteht nach wie vor Bedarf an generell anwendbaren  
Verfahren zur Verbesserung des Ertrages bei land- oder  
forstwirtschaftlich interessanten Pflanzen.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,  
weitere Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen zur Ver-  
fügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung  
der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungs-  
formen gelöst.

20 Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur  
Steigerung des Ertrages bei Pflanzen, das dadurch gekenn-  
zeichnet ist, daß in Pflanzen stabil im Genom integrierte  
rekombinate DNA-Moleküle exprimiert werden, enthaltend

25 (a) eine Region, die die Transkription spezifisch in den Ge-  
leitzellen von Pflanzen erlaubt; und in operativer Ver-  
knüpfung damit

(b) eine Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, aus-  
gewählt aus der Gruppe bestehend aus:

30 (i) Proteinen mit Saccharose-spaltender enzymatischer  
Aktivität;

(ii) Saccharose-Transportern;

35 (iii) Proteinen, deren Aktivität zur Stimulation des  
Protonengradienten an der Plasmamembran pflanzli-  
cher Zellen führt; und

(iv) Citratsynthasen (E.C. 4.1.3.7).

1 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Expression  
der obengenannten Proteine spezifisch im Phloem von Pflanzen  
zu einer drastischen Steigerung des Ertrages führt.

5 Der Begriff "Ertragsteigerung" bedeutet dabei vorzugsweise  
eine Erhöhung der Biomasseproduktion, insbesondere, wenn  
diese am Frischgewicht pro Pflanze gemessen wird.  
Eine derartige Ertragssteigerung bezieht sich vorzugsweise  
auf die sogenannten "sink"-Organe der Pflanze, d.h. diejeni-  
10 gen Organe, die die während der Photosynthese gebildeten  
Photoassimilate aufnehmen. Besonders bevorzugt sind dies  
erntebare Pflanzenteile wie Samen, Früchte, Speicherwurzeln,  
Wurzeln Knollen, Blüten, Knospen, Sprosse, Stämme oder Holz.  
Die Ertragssteigerung beträgt erfindungsgemäß mindestens  
15 3 %, bezogen auf die Biomasse, im Vergleich zu entsprechen-  
den nicht-transformierten Pflanzen desselben Genotyps, wenn  
diese unter denselben Bedingungen kultiviert werden, bevor-  
zugt mindestens 10 % und besonders bevorzugt mindestens  
20 %.

20 Den oben genannten Proteinen ist gemeinsam, daß ihre biolo-  
gische Aktivität bei Expression im Phloem zu einer Erhöhung  
der Beladung des Phloems mit Photoassimilaten führt.  
Unter Photoassimilaten werden im Rahmen der vorliegenden Er-  
findung Zucker und/oder Aminosäuren verstanden.

Generell kann die unter (b) genannte Nucleotidsequenz erfin-  
dungsgemäß sowohl ein pflanzliches als auch ein bakterielles  
Protein oder ein Protein aus Pilzen oder tierischen Organis-  
30 men codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform codiert die Nucleotid-  
sequenz eine Saccharose-Synthase (E.C. 2.4.1.13), vorzugs-  
weise eine aus Pflanzen, insbesondere aus *Solanum tuberosum*,  
35 und besonders bevorzugt die in Knollen von *S. tuberosum* ex-  
primierte Form. Derartige Sequenzen sind beispielsweise be-  
schrieben in Salanoubat und Belliard (Gene 60 (1987), 47-56)

1 und verfügbar in der EMBL-Datenbank unter der Zugriffsnummer  
X67125.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform codiert die  
Nucleotidsequenz eine Saccharose-Phosphorylase (E.C.  
2.4.1.7).

Sequenzen, die Saccharose-Phosphorylase codieren, sind bei-  
spielsweise bekannt aus der WO 96/24679.

10 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform codiert die  
Nucleotidsequenz eine Invertase (E.C. 3.2.1.26), vorzugs-  
weise eine Invertase aus einem Mikroorganismus, insbesondere  
einem Pilz der Gattung *Saccharomyces*, bevorzugt aus *S.*  
15 *cerevisiae*. Besonders bevorzugt sind dabei Sequenzen, die  
eine cytosolische Invertase codieren (Sonnewald et al.,  
Plant J. 1 (1991), 95-106).

Unter einem Saccharose-Transporter wird erfindungsgemäß ein  
Transporter verstanden, der Saccharose in pflanzlichen  
20 Systemen über eine Membran transportiert. Dieser ist vor-  
zugsweise pflanzlich (z.B. EMBL-Genbank Zugriffsnummer  
G21319). Besonders bevorzugt codiert die unter (b) genannte  
Sequenz einen Saccharosetransporter aus Spinat (*Spinacia*  
*oleracea*), insbesondere mit der Sequenz des Clons SoSUT1 wie  
25 beispielsweise beschrieben in Riesmeier et al. (EMBO J. 11  
(1992), 4705-4713).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Pro-  
tein, das den Protonengradienten an der Plasmamembran stimu-  
30 liert, eine Protonen-ATPase.

In diesem Fall codiert die unter (b) genannte Sequenz vor-  
zugsweise ein Protein aus einem Mikroorganismus, insbeson-  
dere einem Pilz der Gattung *Saccharomyces*, bevorzugt aus *S.*  
*cerevisiae*.

35 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform codiert die  
Sequenz die Protonen ATPase PMA1 aus *S. cerevisiae* (Serrano  
et al., Nature 319 (1986), 689-693; EMBL-Genbank) oder eine

am 3'-Ende verkürzte Form dieser Protonen-ATPase aus *S. cerevisiae*, insbesondere die Form  $\Delta$ PMAL wie beschrieben in Beispiel 3 der vorliegenden Erfindung.

Alternativ kann die Nucleotidsequenz auch eine Protonen-ATPase aus Pflanzen codieren, vorzugsweise eine Protonen-ATPase aus *Solanum tuberosum*.

Besonders bevorzugt sind dabei Sequenzen die die Protonen-ATPase PHA2 aus Kartoffel codieren (Harms et al, Plant Mol. Biol. 26 (1994), 979-988; EMBL-Genbank X76535) oder eine am 3'-Ende verkürzte Form dieser Protonen-ATPase aus Kartoffel, insbesondere die Form  $\Delta$ PHA2 wie beschrieben in Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung.

Bei der Citratsynthase kann es sich erfindungsgemäß um jede beliebige Citratsynthase handeln, beispielsweise um solche aus Bakterien, Pilzen, Tieren oder Pflanzen. DNA-Sequenzen, die Citratsynthase codieren sind z.B. von den folgenden Organismen bekannt: *Bacillus subtilis* (U05256 und U05257), *E. coli* (V01501), *R. growazekii* (M17149), *P. aeruginosa* (M29728), *A. anitratum* (M33037) (siehe Schendel et al., Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992), 335-345 und Referenzen darin), *Haloferax volcanii* (James et al. Biochem. Soc. Trans. 20 (1992), 12), *Arabidopsis thaliana* (Z17455) (Unger et al., (1989) Plant Mol. Biol. 13 (1989), 411-418), *B. coagulans* M74818), *C. burnetii* (M36338) (Heinzen et al., Gene 109 (1990), 63-69), *M. smegmatis* (X60513), *T. acidophilum* (X55282), *T. thermophila* (D90117), Schwein (M21197) (Bloxham et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78 (1981), 5381-5385), *N. crassa* (M84187) (Ferea et al., Mol. Gen. Genet. 242 (1994), 105-110), *S. cerevisiae* (Z11113, Z23259, M14686, M54982, X00782) (Suissa et al., EMBO J. 3 (1984), 1773-1781) und Kartoffel (EP 95 91 3066.7).

Bei den in Klammern angegebenen Nummern handelt es sich jeweils um die Zugriffsnummern in der GenEMBL-Datenbank.

1 Die erfindungsgemäß verwendeten Nucleotidsequenzen können  
generell entsprechende Proteine aus jedem beliebigen Orga-  
nismus codieren, insbesondere aus Pflanzen, Pilzen, Bakte-  
rien oder Tieren. Vorzugsweise codieren die Sequenzen Pro-  
5 teine aus Pflanzen oder Pilzen. Als Pflanzen bevorzugt sind  
dabei höhere Pflanzen, insbesondere stärke- oder ölspei-  
chernde Nutzpflanzen, beispielsweise Kartoffel, oder Getrei-  
dearten, wie z.B. Reis, Mais, Weizen, Gerste, Roggen,  
Triticale, Hafer, Hirse etc., sowie Spinat, Tabak, Zucker-  
10 rübe, Soja, Baumwolle usw.

Bei den Pilzen handelt es sich vorzugsweise um solche der  
Gattung *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus* oder  
*Neurospora*, insbesondere um *Saccharomyces cerevisiae*,  
*Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*  
15 *niger* oder *Neurospora crassa*.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen  
Verfahrens ist die unter (a) genannte Region, die eine Ge-  
leitzellen-spezifische Transkription gewährleistet, der Pro-  
20 motor des *rolC*-Gens aus *Agrobacterium rhizogenes*.

Dieser Promotor ist beispielsweise beschrieben in Schmülling  
et al. (Plant Cell (1989), 665-671) und Kühn (Charakterisie-  
rung und Lokalisation des Saccharosetransporters SUT1 in  
Solanaceen, Dissertation (1991), Freie Universität Berlin,  
25 Fachbereich Biologie). Vorzugsweise wird der Bereich des  
Promotors verwendet, der die unter Seq ID Nr. 1 angegebene  
Nucleotidsequenz aufweist.

Neben dem genannten *rolC*-Promotor ist es jedoch für den  
30 Fachmann ohne weiteres möglich, andere Promotoren für eine  
geleitzellspezifische Expression zu verwenden. So sind in  
der Literatur weitere geleitzellspezifische Promotoren be-  
schrieben wie z.B. der Promotor des Saccharosetransporters  
aus *Arabidopsis thaliana* (Truernit und Sauer, Planta 196  
35 (1995), 564-570).

Des weiteren sind in der Literatur für verschiedene RNAs als auch Proteine spezifische Vorkommen in den Geleitzellen beschrieben (siehe z.B. Foley et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 687-695; DeWitt, Plant J. 1 (1991), 121-128; Stadler et al., Plant Cell 7 (1995), 1545-1554). Ausgehend von einem bekannten Protein ist es für einen Fachmann ohne Probleme möglich, mittels Antikörper oder unter Verwendung von aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Oligonucleotiden die cDNA zu isolieren (vgl. z.B. Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Cold Spring Harbor, NY.). Ausgehend von den so erhaltenen cDNAs ist es weiterhin möglich, aus dem jeweiligen Organismus angelegte genomische Banken zu durchmustern und genomische Fragmente zu identifizieren. Durch Vergleich der Nucleotidsequenz der cDNA und des genomischen Clones kann ein erster Einblick in die Lage des Promotors erhalten werden. Die Spezifität des Promotors kann sodann in einer transgenen Situation unter Verwendung von chimären Genen bestehend aus dem Promotor und Indikatorgenen, wie z.B. der  $\beta$ -Glucuronidase verifiziert werden (vgl. z.B. Kertbundit et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 5212-5216).

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich prinzipiell auf alle beliebigen Pflanzen anwenden. In Betracht kommen daher insbesondere monokotyle als auch dikotyle Pflanzenarten. Bevorzugt wird das Verfahren bei Pflanzen mit landwirtschaftlichem, gartenwirtschaftlichem und/oder forstwirtschaftlichem Interesse angewendet.

Beispiele hierfür sind Gemüsepflanzen, wie z.B. Gurke, Melone, Kürbis, Aubergine, Zucchini, Tomate, Spinat, Kohlartern, Erbsen, Bohnen, etc., sowie Obstarten, wie z.B. Birnen, Äpfel, usw.

In Betracht kommen ferner ölspeichernde Pflanzen, wie z.B. Raps, Sonnenblume, Soja, sowie in einer besonders bevorzugten Ausführungsform stärke-speichernde Pflanzen, wie insbesondere Getreidearten (Reis, Mais, Weizen, Roggen, Hafer,



1 Triticale, Hirse, Gerste, Kartoffel, Maniok, Süßkartoffel  
etc.

Das Verfahren kann ebenfalls angewendet werden bei Saccha-  
rose-speichernden Pflanzen, wie z.B. Zuckerrübe und Zucker-  
5 rohr, aber auch bei anderen Nutzpflanzen, wie beispielsweise  
Baumwolle, Tabak, Holzarten, Wein, Hopfen usw.

Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Nucleinsäure-  
moleküle, enthaltend

- 10 (a) eine Region, die die Transkription spezifisch in den Ge-  
leitzellen von Pflanzen erlaubt; und in operativer Ver-  
knüpfung damit
- (b) eine Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, aus-  
gewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 15 (i) Saccharose-Synthasen;  
(ii) Saccharose-Phosphorylasen;  
(iii) Saccharose-Transportern;  
(iv) Proteine, deren Aktivität zur Stimulierung des  
Protonengradienten an der Plasmamembran pflanzli-  
20 cher Zellen führt, und  
(v) Citratsynthasen.

Hinsichtlich der bevorzugten Ausführungsformen derartiger  
Moleküle trifft für die unter (a) genannte Region und die  
25 unter (b) genannte Nucleotidsequenz dasselbe zu, was bereits  
oben im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ge-  
sagt wurde.

Die Erfindung betrifft auch Vektoren, die erfindungsgemäße  
30 Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere solche, die zur  
Transformation pflanzlicher Zellen geeignet sind sowie zur  
Integration von Fremd-DNA in das pflanzliche Genom.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Pflanzenzellen,  
35 die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül trans-  
formiert sind und dieses stabil im Genom integriert enthal-  
ten. Diese Zellen unterscheiden sich von natürlicherweise

1 auftretenden Pflanzenzellen beispielsweise dadurch, daß ein  
erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül an einer Stelle in dem  
Genom der Zelle integriert ist, in der es natürlicherweise  
nicht vorkommt.

5

Die Erfindung betrifft auch transgene Pflanzen, die erfin-  
dungsgemäße Pflanzenzellen enthalten und die aufgrund der  
Expression des in dem Genom integrierten rekombinanten  
Nucleinsäuremoleküls in den Geleitzellen der Pflanzen eine  
10 Steigerung des Ertrages aufweisen im Vergleich zu entspre-  
chenden nicht-transformierten Pflanzen, die unter gleichen  
Bedingungen kultiviert wurden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Vermehrungsmate-  
15 rial von erfindungsgemäßen Pflanzen enthaltend die oben be-  
schriebenen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen. Der Begriff  
"Vermehrungsmaterial" umfaßt dabei insbesondere Samen,  
Früchte, Knollen, Rhizome, Stecklinge, Calli, Zellkulturen  
etc.

20

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwen-  
dung von rekombinanten Nucleinsäuremolekülen enthaltend eine  
Region, die die Transkription spezifisch in den Geleitzellen  
von Pflanzen erlaubt und, in operativer Verknüpfung damit,  
25 eine Nucleotidsequenz codierend ein Polypeptid ausgewählt  
aus der Gruppe bestehend aus:

- (i) Proteinen mit Saccharose-spaltender enzymatischer Ak-  
tivität;
- (ii) Saccharose-Transportern;
- 30 (iii) Proteinen, deren Aktivität zur Stimulation des Proto-  
nengradienten an der Plasmamembran führt; und
- (iv) Citratsynthasen

zur Expression in transgenen Pflanzen zur Steigerung des Er-  
trages.

35 Bei den codierten Proteinen handelt es sich vorzugsweise um  
die im vorangehenden näher beschriebenen Proteine.

Verfahren zur Transformation monokotyler und dikotyler Pflanzen sind dem Fachmann bekannt.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden.

Die Verwendung von Agrobakterien für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in der EP-A 120 516, in Hoekema (In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V) Fraley et al. (Crit. Rev. Plant. Sci. 4, 1-46) und An et al. (EMBO J. 4 (1985), 277-287) beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A.

1 Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 3, 627-659, VCH Weinheim-New  
York-Basel-Cambridge.

Die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vek-  
torsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* ist wohl  
5 etabliert. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, daß auch mono-  
kotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* ba-  
sierender Vektoren zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol.  
Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994),  
271-282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34;  
10 Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et  
al., Bio/Technology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse;  
Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al.,  
Transgenic Res. 2 (1993), 252-265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen  
15 Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen  
Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48;  
Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et  
al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317-325; Spencer et al.,  
Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), die Protoplasten-  
20 transformation, die Elektroporation von partiell permeabili-  
sierten Zellen, sowie die Einbringung von DNA mittels Glas-  
fasern.

Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Litera-  
tur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP  
25 C 513 849; EP C 465 875; Fromm et al., Biotechnology 8  
(1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990),  
603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200).  
In EP 292 435 und in Shillito et al. (Bio/Technology 7  
(1989), 581) wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe des-  
30 sen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable)  
granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden  
können.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschrei-  
ben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus  
35 Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1.

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten  
wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux,

1 s.o.; Ritala et al., s.o. und für Weizen Nehra et al.,  
Plant J. 5 (1994), 285-297).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle  
integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt  
5 auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten  
Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektions-  
marker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz ge-  
genüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin,  
G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. ver-  
10 mittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die  
Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die  
eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in  
der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell  
15 Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können  
normal angezogen. Von den Pflanzen können Samen gewonnen  
werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden,  
um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil  
20 beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet  
werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp  
oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Figur 1 zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids  
25 pBinRolC-SS.

Figur 2a zeigt die Analyse der Saccharose-Synthase (SS)-Ak-  
tivität in Blättern transgener Kartoffelpflanzen,  
die mit dem RolC-SS-Konstrukt transformiert worden  
30 waren. Die Enzymaktivität wurde nach Zrenner et  
al., Plant J. 7 (1995), 97-107) bestimmt. Die  
Aktivität ist angegeben in  $\mu\text{mol Hexose-Äquivalen-}$   
 $\text{te} / (\text{min} \times \text{g Frischgewicht})$ .  
Die Säulen stellen Durchschnittswerte von 3 Proben  
35 pro Genotyp dar. Die Standardabweichung ist eben-  
falls angegeben.

1      **Figur 2b** zeigt die Analyse des Knollenertrages von trans-  
          genen Kartoffelpflanzen, die mit dem RolC-SS-Konstrukt transformiert worden waren. Die Säulen  
          stellen Durchschnittswerte von 10-15 Pflanzen pro  
 5      Genotyp dar. Die Standardabweichung ist ebenfalls  
          angegeben. Der Knollenertrag ist angegeben in g  
          Frischgewicht

**Figur 2c** zeigt die Analyse der Knollenstärke von transgenen  
 10      Kartoffelpflanzen, die mit dem RolC-SS-Konstrukt  
          transformiert worden waren. Dazu wurde die Knol-  
          lenernte von 10-15 Pflanzen pro Genotyp zusammen-  
          gefaßt und der Stärkegehalt der Knollen nach Von  
 15      Schéele et al. (Landw. Vers.Sta. 127 (1937), 67-  
          96) bestimmt.

**Figur 3** zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids  
          pBinRolC-Suc2.

20      **Figur 4** zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids  
          pBinRolC- $\Delta$ PMA1.

**Figur 5** zeigt schematisch die Clonierungsstrategie von  
           $\Delta$ PMA1.

25      Schritt von A nach B:

         Über PCR mit der cDNA-PMA1 als Matritze und kom-  
          plementären internen Primern wurde die am 3'-Ende  
          verkürzte H<sup>+</sup>-ATPase  $\Delta$ PMA1 amplifiziert (A). Die  
          flankierenden Restriktionsschnittstellen des PCR-  
 30      Produkts (B) wurden durch die entsprechend synthe-  
          tisierten Primer eingeführt.

         Schritt von B nach C:

         PstI/NotI Verdau und Clonierung des PCR-Fragments  
          in den E.coli Vektor SK- über PstI/NotI Schnitt-  
 35      stellen (C).

         Schritt von C nach D:

BclI, SpeI Verdau des Plasmids SK- $\Delta$ PMA1 und Clonierung des Fragments in die kompatiblen BamHI, XbaI Schnittstellen des pBinRolC (D)

**Figur 6** stellt die Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion mit spezifischen Oligonucleotiden als Nachweis der stabilen Integration von  $\Delta$ PMA1 im Genom von transgenen Pflanzen dar, die durch Transformation mit dem rolC- $\Delta$ PMA1-Konstrukt gewonnen worden waren. PCR-Produktgröße = 730 bp; WT = Wildtyp; M = Marker.

**Figur 7** zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids pBinRolC- $\Delta$ PHA2.

**Figur 8** zeigt schematisch die Clonierungsstrategie von  $\Delta$ PHA2.

Schritt von A nach B:

Über PCR mit der cDNA-PHA2 als Matrize und komplementären internen Primern wurde die am 3'-Ende verkürzte H<sup>+</sup>-ATPase  $\Delta$ PHA2 amplifiziert (A). Die flankierenden Restriktionsschnittstellen des PCR-Produkts (B) wurden durch die entsprechend synthetisierten Primer eingeführt.

Schritt von B nach C:

PstI/EcoRI Verdau und Clonierung des PCR-Fragments in den E.coli Vektor SK- über PstI/EcoRI Schnittstellen (C)

Schritt von C nach D:

BglII/SpeI Verdau des Plasmids SK- $\Delta$ PHA2 und Clonierung des Fragments in die kompatiblen BamHI/XbaI Schnittstellen des pBinRolC (D)

**Figur 9** zeigt die Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion mit spezifischen Oligonucleotiden als Nachweis der stabilen Integration von  $\Delta$ PHA2 im Genom von transgenen Pflanzen, die durch Transformation

1 mit dem rolC- $\Delta$ PHA2-Konstrukt gewonnen worden wa-  
ren. PCR-Produktgröße = 758 bp; WT = Wildtyp; M =  
Marker.

5 **Figur 10** zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids  
pBinRolC-SoSUT1.

**Figur 11** zeigt schematisch die Konstruktion des Plasmids  
pBinRolC-CiSy.

10 **Figur 12** zeigt die Ergebnisse der Bestimmung des Saccharo-  
segehaltes in parenchymatischen und mit vasculärem  
Gewebe angereicherten Proben von Knollen gepfropf-  
ter Kartoffelpflanzen. Zur Pfropfung verwendete  
15 Genotypen sind die Linien RolC-Suc2-#25 (cytosoli-  
sche Invertase) und Wildtyp *Solanum tuberosum* var.  
*Désirée*. Der Saccharosegehalt wurde nach Stitt et  
al. (Methods Enzymol. 174 (1989), 518-522) be-  
stimmt. Die Säulen stellen Durchschnittswerte von  
20 12 Proben pro Pfropfungstyp dar. Die Standardab-  
weichung ist angegeben. Der Saccharosegehalt ist  
angegeben als  $\mu$ mol Hexose-Äquivalente/g Frisch-  
gewicht.

25 **Figur 13** zeigt die Analyse von Phloem-Exudaten von  $\Delta$ PMA1-  
Blättern, die im Licht für 6 Stunden in einer  
14CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten wurden. Der Saccharose-  
gehalt wurde nach Stitt et al. (a.a.O.) bestimmt.  
Die Säulen stellen Durchschnittswerte von vier bis  
30 fünf Proben pro Genotyp dar. Die Standardabwei-  
chung ist angegeben.

**Figur 14** zeigt den Knollenertrag (in Gramm Frischgewicht)  
von  $\Delta$ PMA1-Pflanzen. Die Säulen stellen Durch-  
schnittswerte von sechs Pflanzen pro Genotyp dar.  
35 Die Standardabweichung ist angegeben. Der Knollen-  
ertrag ist angegeben in g Frischgewicht.



Figur 15 zeigt den Knollenertrag (in Gramm Frischgewicht von  $\Delta$ PHA2-Pflanzen. Die Säulen stellen Durchschnittswerte von vier bis fünf Pflanzen pro Genotyp dar. Die Standardabweichung ist angegeben. Der Knollenertrag ist angegeben in g Frischgewicht.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der näheren Erläuterung der Erfindung.

### Beispiel 1

#### Herstellung des Plasmids pBinRolC-SS und Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

Das Plasmid pBinRolC-SS enthält die drei Fragmente A, B und C im binären Vektor pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) (vgl. Fig. 1).

Das Fragment A umfaßt den rolC-Promotor aus *Agrobacterium rhizogenes*. Der rolC-Promotor enthält als EcoRI/Asp718 DNA-Fragment von 1138 bp (Lerchl et al., Plant Cell 7 (1995), 259-270) die DNA-Region (Position: 11306 bis Position 12432) der TL-DNA des Ri-Agropin-Typ-Plasmids von *A. rhizogenes* (Slightom et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 108-121). Das Fragment A ist in die Schnittstellen EcoRI und Asp718 des Polylinkers von pBin19 insertiert.

Das Fragment B enthält die codierende Region (Position: 76 bis Position 2493) der cDNA der Saccharose-Synthase (SS) aus *Solanum tuberosum* (Salanoubat und Belliard, Gene 60 (1987), 47-56). Das Fragment B wurde als BamHI-Fragment von 2427 bp aus dem Vektor pBluescript SK<sup>-</sup> erhalten, in welchem es in der BamHI-Schnittstelle des Polylinkers insertiert ist. Das Fragment B wurde in den Vektor pBin19 in die BamHI-Schnittstelle in Sinnorientierung insertiert, d.h. stromabwärts des rolC-Promotors in einer Orientierung, die die Transkription einer translatierbaren RNA ermöglicht.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTi ACH 5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 - 846), insbesondere die Nucleotide 11749 - 11939, welches als PvuII/HindIII-Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., Nature 303 (1983), 209 - 213) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI- und die HindIII-Schnittstelle des Polylinkers von pBin19 cloniert worden ist.

Das resultierende Plasmid pBinRolC-SS wurde über den Agrobacterium tumefaciens vermittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzenzellen eingeführt. Dazu wurden zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffelsterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv.) Desirée) in 10 ml MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. 15 (1962), 473 mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen Agrobacterium tumefaciens-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5-minütiger, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für zwei Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallus-Induktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 µg/l Naphthylelessigsäure, 20 µg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar gelegt.

Die Analyse der Blätter einer Reihe von mit diesem Vektorsystem transformierten Pflanzen, zeigte eindeutig das Vorkommen einer erhöhten Saccharose-Synthase-Aktivität. Dies ist auf die Expression des in pBinRolC-SS enthaltenen Saccharose-Synthasegens aus Kartoffel zurückzuführen (vgl. Figur 2a).

Die Analyse des Knollenertrages (Knollen-Frischgewicht in Gramm) von mit diesem Vektorsystem transformierten Pflanzen, die eine erhöhte Saccharose-Synthase-Aktivität aufweisen,

1 ergab eindeutig eine Erhöhung des Knollenertrages. Dies ist  
ebenfalls auf die Expression des in pBinRolC-SS enthaltenen  
Saccharose-Synthasegens aus Kartoffel zurückzuführen (vgl.  
Figur 2b).

5 Der Stärkegehalt von Kartoffelknollen ist linear von der  
Dichte der Knollen abhängig (von Schéele et al., Landw.  
Vers. Sta. 127 (1937), 67-96). Überraschenderweise zeigte  
die Analyse der Dichte von transgenen Knollen, der mit dem  
Vektorsystem pBinRolC-SS transformierten Pflanzen, welche  
10 eine erhöhte Saccharose-Synthase-Aktivität aufweisen, eine  
Erhöhung des Stärkegehaltes. Dieses ist auf die Expression  
des in pBinRolC-SS enthaltenen Saccharose-Synthasegens aus  
Kartoffel zurückzuführen (vgl. Figur 2c)

## 15 Beispiel 2

### Herstellung des Plasmids pBinRolC-Suc2 und Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

20 Das Plasmid pBinRolC-Suc2 enthält die drei Fragmente A, B  
und C im binären Vektor pBin19 (Bevan, loc cit.) und ist in  
Figur 3 dargestellt.

Die Fragmente A und C entsprechen den Fragmenten A und C,  
wie in Beispiel 1 beschrieben.

Das Fragment B enthält die codierende Region (Position: 845  
bis Position: 2384) des Gens der cytosolischen Invertase aus  
Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Das Fragment B wurde als  
BamHI-Fragment mit einer Länge von 1548 bp aus dem Vektor  
30 pBluescript SK<sup>-</sup> erhalten, in dem es in die Schnittstelle  
BamHI des Polylinkers insertiert ist. Das Fragment B ist im  
pBin19 in die BamHI-Schnittstelle in Sinnorientierung inser-  
tiert.

- 1 Das Plasmid pBinRolC-Suc2 wurde über den Agrobacterium ver-  
mittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzenzellen eingeführt.  
Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regene-  
riert.
- 5 Derartige Pflanzen zeigen im Vergleich zu nicht-  
transformierten Pflanzen einen erhöhten Ertrag (Steigerung  
der Biomasse).

### Beispiel 3

10

#### Herstellung des Plasmids pBinRolC- $\Delta$ PMA1 und Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

15

Das Plasmid pBinRolC- $\Delta$ PMA1 enthält die drei Fragmente A, B  
und C im binären Vektor pBin19 (Bevan, loc cit.) und ist in  
Figur 4 schematisch dargestellt.

Die Fragmente A und C entsprechen den Fragmenten A und C wie  
in Beispiel 1 beschrieben.

20

Das Fragment B enthält die codierende Region (Position: 937  
bis Position: 3666) des Gens der Protonen-ATPase PMA1 aus  
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano et al., Nature  
319 (1986), 689-693). Das Fragment B wurde mittels Polyme-  
rase-Ketten-Reaktion (PCR) erhalten. Dabei wurde absichtlich  
das 3'-Ende der codierenden Region des Gens PMA1 um 27 bp  
verkürzt und gleichzeitig ein notwendiges neues Stopcodon  
eingeführt. Dieses so modifizierte DNA-Fragment wurde  $\Delta$ PMA1  
genannt. Das Fragment B wurde als BclI/SpeI-Fragment mit  
einer Länge von 2739 bp in die Schnittstellen BamHI (kompa-  
tible Insertionsstelle für BclI-Schnittenden) und XbaI (kom-  
patible Insertionsstelle für SpeI-Schnittenden) des Vektors  
pBin19 in Sinnorientierung inseriert.

30

Das Fragment B als BclI/SpeI-Fragment wurde aus dem Vektor  
pBluescript SK<sup>+</sup> erhalten, in dem es über die Schnittstellen  
NotI und PstI des Polylinkers inseriert ist (vgl. Fig. 5).

35

1 Das Plasmid pBinRolC- $\Delta$ PHA1 wurde über den Agrobacterium ver-  
mittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzenzellen eingeführt.  
Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regene-  
riert.

5 Die stabile Integration von  $\Delta$ PHA1 im Genom transgener Pflan-  
zen, die unter Einsatz des Vektorsystems pBinRolC-  $\Delta$ PHA1 ge-  
wonnen worden waren, wurde mittels Polymerase-Ketten-Reak-  
tion (PCR) nachgewiesen (vgl. Fig. 6).

Die transformierten Pflanzen zeigen im Vergleich zu nicht-  
10 transformierten Pflanzen einen erhöhten Ertrag (Steigerung  
der Biomasse) (siehe Figuren 13 und 14).

#### Beispiel 4

15 **Herstellung des Plasmids pBinRolC- $\Delta$ PHA2 und Herstellung  
transgener Kartoffelpflanzen**

Das Plasmid pBinRolC- $\Delta$ PHA2 enthält die drei Fragmente A, B  
und C im binären Vektor pBin19 (Bevan, loc cit.) und ist in  
20 Figur 7 schematisch dargestellt.

Die Fragmente A und C entsprechen den Fragmenten A und C wie  
in Beispiel 1 beschrieben.

Das Fragment B enthält die codierende Region (Position: 64  
bis Position: 2672) der cDNA der Protonen-ATPase PHA2 (Harms  
et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 979-988). Das Fragment B  
wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erhalten. Da-  
bei wurde absichtlich das 3'-Ende der codierenden Region des  
Gens PHA2 um 249 bp verkürzt und gleichzeitig zwei neue  
30 Stopcodons eingeführt. Dieses so modifizierte DNA-Fragment  
wurde  $\Delta$ PHA2 genannt. Das Fragment B wurde als BglII/SpeI-  
Fragment mit einer Länge von 2631 bp in die Schnittstellen  
BamHI (kompatible Insertionsstelle für BglII-Schnittenden)  
und XbaI (kompatible Insertionsstelle für SpeI-Schnittenden)  
35 des Vektors pBin19 in Sinnorientierung inseriert.

1 Das Fragment B wurde als BglII/SpeI-Fragment aus dem Vektor  
pBluescript SK<sup>-</sup> erhalten, in dem es in die EcoRI- und PstI-  
Schnittstellen der Polylinker Sequenz insertiert ist (vgl.  
Fig. 8: Clonierungsstrategie- $\Delta$ PHA2).

5

Das Plasmid pBinRolC- $\Delta$ PHA2 wurde über den Agrobacterium ver-  
mittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzenzellen eingeführt.  
Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflanzen regene-  
riert.

10 Die stabile Integration von  $\Delta$ PHA2 im Genom transgener Pflan-  
zen, die unter Einsatz des Vektorsystems pBinRolC-  $\Delta$ PHA2 ge-  
wonnen wurden, wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion  
(PCR) nachgewiesen (vgl. Fig. 9).

Die transformierten Pflanzen zeigen im Vergleich zu nicht-  
15 transformierten Pflanzen einen erhöhten Ertrag (Steigerung  
der Biomasse) (siehe Figur 15).

#### Beispiel 5

20 **Herstellung des Plasmids pBinRolC-SoSUT1 und Herstellung  
transgener Kartoffelpflanzen**

Das Plasmid pBinRolC-SoSUT1 enthält die drei Fragmente A, B  
und C im binären Vektor pBin19 (Bevan, loc cit.) und ist  
25 schematisch in Figur 10 dargestellt.

Die Fragmente A und C entsprechen den Fragmenten A und C wie  
in Beispiel 1 beschrieben.

Das Fragment B enthält die cDNA (Position: 1 bis Position:  
30 1969), die einen Saccharosetransporter aus Spinat (*Spinacia  
oleracea*) codiert (Riesmeier et al., EMBO J. 11 (1992),  
4705-4713; Zugriffsnummern X67125 and S51273). Das Fragment  
B wurde als NotI-Fragment aus dem Vektor pBluescript SK<sup>-</sup> er-  
halten, in dem es über eine NotI-Linker-Sequenz insertiert  
35 ist. Zur Clonierung in die SmaI-Schnittstelle des Vektors  
pBin19 wurden die NotI-Schnittenden des Fragments in glatte  
Enden überführt und in Sinnorientierung in den pBin19 inser-

1 tiert. Das resultierende Plasmid wurde pBinRolC-SoSUT1 ge-  
nannt.

Es wurde über den Agrobacterium vermittelten Gentransfer in  
Kartoffelpflanzenzellen eingeführt. Aus transformierten Zel-  
5 len wurden intakte Pflanzen regeneriert.

Derartige transformierte Pflanzen zeigen im Vergleich zu  
nicht-transformierten Pflanzen einen erhöhten Ertrag (Stei-  
gerung der Biomasse).

10

### Beispiel 6

#### Herstellung des Plasmids pBinRolC-CiSy und Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

15 Das Plasmid pBinRolC-CiSy enthält die drei Fragmente A, B und  
C im binären Vektor pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12  
(1984), 8711) modifiziert nach Becker, Nucl. Acids Res. 18  
(1990) 203 (vgl. Fig. 11).

Das Fragment A umfaßt den rolC-Promotor aus Agrobacterium  
rhizogenes. Der rolC-Promotor enthält als EcoRI/Asp718 DNA-  
20 Fragment von 1143 bp (Lerchl et al., The Plant Cell 7  
(1995), 259-270) die DNA-Region (Position: 11306 bis Posi-  
tion 12432) der TL-DNA des Ri-Agropin-Typ-Plasmids von A.  
rhizogenes (Slightom et al., J. Biol. Chem. 261 (1986), 108-  
25 121). Das Fragment A ist in die Schnittstellen EcoRI und  
Asp718 des Polylinkers von pBin19 inseriert.

Das Fragment B enthält die codierende Region der cDNA der  
Citrat-Synthase (CiSy) aus der Sproßhefe Saccharomyces  
cerevisiae. Das Fragment B wurde als BamHI-Fragment von 1400  
30 bp aus dem Vektor pBluescript SK- erhalten, in welchem es in  
der BamHI-Schnittstelle des Polylinkers inseriert ist  
(Landschütze, Untersuchungen zur Beeinflussung der Acetyl-  
CoA-Synthase und Verwendung in transgenen Pflanzen, Disser-  
tation, Freie Universität Berlin, (1985) D83/FB15 Nr. 028).

35 Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens  
3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH 5 (Gielen et al., EMBO J.  
3 (1984), 835-846), Nucleotide 11749-11939, welches als

1 PvuII/HindIII-Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-  
Estrella et al., Nature 303 (1983), 209-213) isoliert worden  
ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnitt-  
stelle zwischen die SphI- und die HindIII-Schnittstelle des  
5 Polylinkers von pBin19 cloniert worden ist.

Das Plasmid pBinRolC-CiSy hat eine Größe von ca. 13 kb.

Das Plasmid pBinRolC-CiSy wurde über den Agrobacterium  
tumefaciens vermittelten Gentransfer in Kartoffelpflanzen  
eingeführt. Aus transformierten Zellen wurden intakte Pflan-  
10 zen regeneriert.

Die Analyse einer Reihe von mit diesem Vektorsystem trans-  
formierten Pflanzen, zeigte eindeutig eine Erhöhung der Bio-  
masse, was auf die Expression der in pBinRolC-CiSy enthalte-  
nen CiSy-cDNA aus Hefe zurückzuführen ist.

15

### Beispiel 7

#### Pfropfungsexperiment

20 Beim Pfropfen ("Grafting") wird der Sproß einer Empfänger-  
pflanze durch den einer Donorpflanze ersetzt.

In dem hier beschriebenen Experiment wird der Sproß einer  
transgenen Pflanze (RolC-Suc2 #25) auf die Basis einer Wild-  
25 typ-Pflanze (Solanum tuberosum, var. Désirée) gepfropft. Als  
Kontrolle um experimentell bedingte Kultivierungsunter-  
schiede auszuschließen, wird ein Wildtypsproß auf eine Wild-  
typbasis gepfropft (Autopfropfung). Ziel des Versuchs ist,  
den alleinigen Einfluß der Photosyntheseleistung und Pho-  
30 toassimilatverteilung eines transgenen Sprosses auf Organe  
(in diesem Fall Knollen) einer Wildtyppflanzenbasis zu un-  
tersuchen.

Kartoffelpflanzen werden aus Gewebekultur in Erde gepflanzt  
und ins Gewächshaus überführt. Nach ca. 5 Wochen (Pflanzen  
35 haben in diesem Stadium noch keine Knollenbildung induziert)  
werden die Pflanzen gepfropft. Dazu wird der nicht ge-  
brauchte Sproß der Empfängerpflanze abgeschnitten und der



- 1 Stamm der Empfängerpflanze keilförmig eingeschnitten. Der  
aufzupfropfende Donorsproß wird am Stammende dementsprechend  
zurechtgeschnitten und in den Keil der Empfängerpflanze ein-  
gesetzt. Die Pfropfungsstelle wird mit Klebeband fixiert.
- 5 Anschließend werden die gepfropften Kartoffelpflanzen für  
ca. eine Woche unter erhöhter Luftfeuchtigkeit und schatti-  
gen Bedingungen gehalten. Danach werden sie, innerhalb von  
7-10 Tagen, schrittweise an normale Gewächshausbedingungen  
adaptiert. Die Pflanzen sind dann ca. 7 Wochen alt.
- 10 Alle Blätter der Basispflanze werden nun entfernt und der  
Stamm derselben mit Alufolie abgedunkelt, um zu gewährlei-  
sten, daß im weiteren nur die Photosyntheseleistung und Pho-  
toassimilatverteilung des Donorsprosses die Basis der  
gepfropften Pflanze versorgt.
- 15 Bis zur Ernte der Kartoffelknollen, ca. 2 Monate nach der  
Pfropfung bzw. ca. 3 Monate nach der Pflanzung in Erde, ver-  
bleiben die Pflanzen im Gewächshaus. Die Ergebnisse eines  
solchen Pfropfungsexperiments sind in Figur 12 dargestellt.

20

30

35

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der  
Wissenschaften e.V
- (B) STRASSE: keine
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: keine

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Ertragssteigerung in  
Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1138 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Agrobacterium rhizogenes

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AATTCGATAC GAAAAAGGCA AGTGCCAGGG CCATTAAAA TACGGCGTCG GAAACTGGCG	60
CCAATCAGAC ACAGTCTCTG GTCGGGAAAG CCAGAGGTAG TTTGGCAACA ATCACATCAA	120
GATCGATGCG CAAGACACGG GAGGCCTTAA AATCTGGATC AAGCGAAAAT ACTGCATGCG	180
TGATCGTTCA TGGGTTTATA GTACTGGGTT TGCTTTTCT TGTCGTGTTG TTTGGCCTTA	240
GCGAAAGGAT GTCAAAAAAG GATGCCATA ATTGGGAGGA GTGGGGTAAA GCTTAAAGTT	300
GGCCCGCTAT TGGATTTTCG GAAAGCGCA TTGGCAAACG TGAAGATTGC TGCATTCAAG	360
ATACTTTTTC TATTTTCTGG TTAAGATGTA AAGTATTGCC ACAATCATAT TAATTACTAA	420

CATTGTATAT GTAATATAGT GCGGAAATTA TCTATGCCAA AATGATGTAT TAATAATAGC	480
AATAATAATA TGTGTTAATC TTTTTCATC GGAATACGT TTAAGCGATT ATCGTGTGA	540
ATAAATTATT CCAAAGGAA ATACATGGTT TTGGAGAACC TGCTATAGAT ATATGCCAAA	600
TTTACACTAG TTTAGTGGGT GCAAACTAT TATCTCTGTT TCTGAGTTTA ATAAAAATA	660
AATAAGCAGG GCGAATAGCA GTTAGCCTAA GAAGGAATGG TGGCCATGTA CGTGCTTTTA	720
AGAGACCCTA TAATAAATTG CCAGCTGTGT TGCTTTGGTG CCGACAGGCC TAACGTGGGG	780
TTTAGCTTGA CAAAGTAGCG CCTTTCGCA GCATAAATAA AGGTAGGCGG GTGCGTCCCA	840
TTATTAAAGG AAAAAGCAAA AGCTGAGATT CCATAGACCA CAAACCACCA TTATTGGAGG	900
ACAGAACCTA TTCCCTCACG TGGGTCGCTA GCTTTAAACC TAATAAGTAA AAACAATTAA	960
AAGCAGGCAG GTGTCCCTTC TATATTGCA CAACGAGGCG ACGTGGAGCA TCGACAGCCG	1020
CATCCATTAA TTAATAAATT TGTGGACCTA TACCTAACTC AAATATTTTT ATTATTGCT	1080
CCAATACGCT AAGAGCTCTG GATTATAAAT AGTTTGATG CTTCGAGTTA TGGGGTAC	1138

P a t e n t a n s p r ü c h e

1

5

10

15

20

25

30

35

1. Verfahren zur Steigerung des Ertrages bei Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß in Pflanzen stabil im Genom integrierte rekombinante DNA-Moleküle exprimiert werden, enthaltend
  - (a) eine Region, die die Transkription spezifisch in den Geleitzellen von Pflanzen erlaubt; und in operativer Verknüpfung damit
  - (b) eine Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
    - (i) Protonen mit Saccharose-spaltender enzymatischer Aktivität;
    - (ii) Saccharose-Transportern;
    - (iii) Proteinen, deren Aktivität zur Stimulation des Protonengradienten an der Plasmamembran pflanzlicher Zellen führt; und
    - (iv) Citratsynthasen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz ein pflanzliches Protein codiert.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz ein Protein aus einem Bakterium oder einem Pilz codiert.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz ein Protein mit Saccharose-spaltender enzymatischer Aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Saccharose-Synthasen, Saccharose-Phosphorylasen und Invertasen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz einen Saccharosetransporter aus *Spinacia oleracea* codiert.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz eine Protonen-ATPase codiert.

1  
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Nucleotidsequenz eine Protonen-ATPase aus *Solanum tuberosum* oder aus *Saccharomyces cerevisia* codiert.

5  
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die unter (a) genannte Region der *rolC*-Promotor aus *Agrobacterium rhizogenes* ist.

10  
9. Rekombinantes Nucleinsäuremolekül enthaltend  
(a) eine Region, die die Transkription spezifisch in den Geleitzellen von Pflanzen erlaubt; und in operativer Verknüpfung damit  
(b) eine Nucleotidsequenz, die ein Polypeptid codiert,  
15 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
(i) Saccharose-Synthasen;  
(ii) Saccharose-Phosphorylasen;  
(iii) Saccharose-Transportern;  
(iv) Proteinen, deren Aktivität zur Stimulation des  
20 Protonengradienten an der Plasmamembran pflanzlicher Zellen führt; und  
(v) Citratsynthasen.

25  
10. Vektor, enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruche 9.

30  
11. Vektor nach Anspruch 10, der zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet ist und zur Integration von Fremd-DNA in das pflanzliche Genom.

12. Pflanzenzelle transformiert mit und enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 9.

35  
13. Pflanze, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 12, wobei die Pflanze aufgrund der Expression des rekombinanten Nucleinsäuremoleküls in den Geleitzellen der Pflanze

1           zen eine Steigerung des Ertrages im Vergleich zu einer  
entsprechenden nicht-transformierten Pflanze aufweist.

5           14. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach Anspruch 13, ent-  
haltend Pflanzenzellen nach Anspruch 12.

10           15. Verwendung eines rekombinanten Nucleinsäuremoleküls ent-  
haltend eine Region, die die Transkription spezifisch in  
den Geleitzellen von Pflanzen erlaubt und, in operativer  
Verknüpfung damit, eine Nucleotidsequenz, die ein Poly-  
peptid codiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  
          (i)    Proteinen mit Saccharose-spaltender enzymatischer  
                 Aktivität;  
          (ii)   Saccharose-Transportern;  
15           (iii) Proteinen, deren Aktivität zur Stimulation des  
             Protonengradienten an der Plasmamembran führt; und  
          (iv)   Citratsynthasen,  
zur Expression in transgenen Pflanzen zur Steigerung des  
Ertrages.

20

25

30

35

1

5

Zusammenfassung

## Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen

10

Es werden Verfahren zur Ertragssteigerung in Pflanzen beschrieben, bei denen Nucleotidsequenzen unter der Kontrolle Geleitzellen-spezifischer Promotoren exprimiert werden. Die Nucleotidsequenzen codieren Proteine, deren Expression zu einer Stimulierung der Beladung des Phloems mit Photoassimilaten führt.

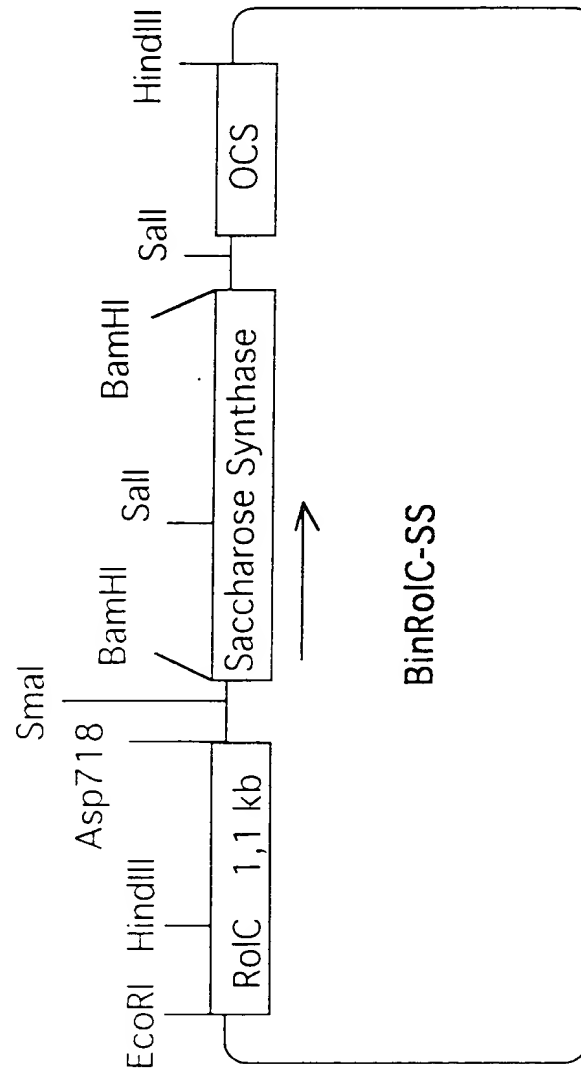
15

20

25

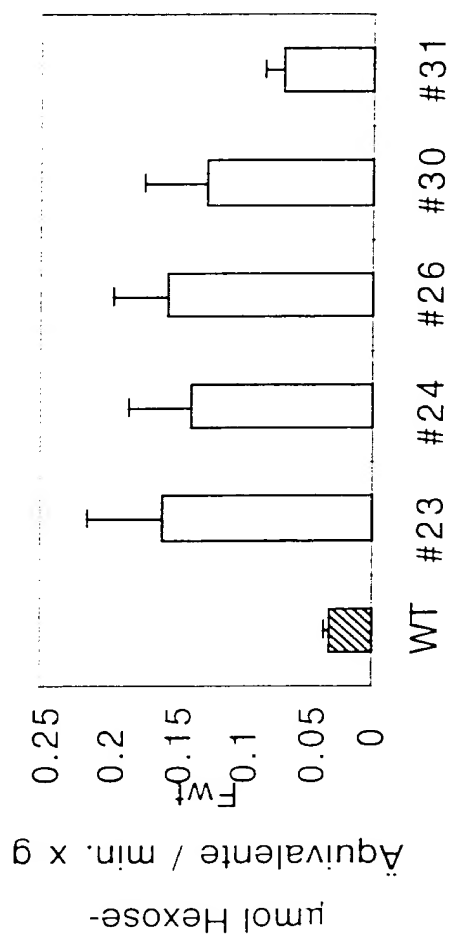
30

35

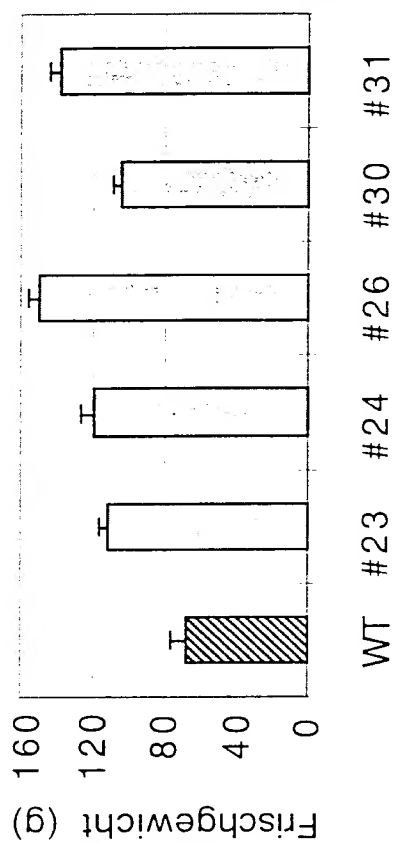


Figur 1

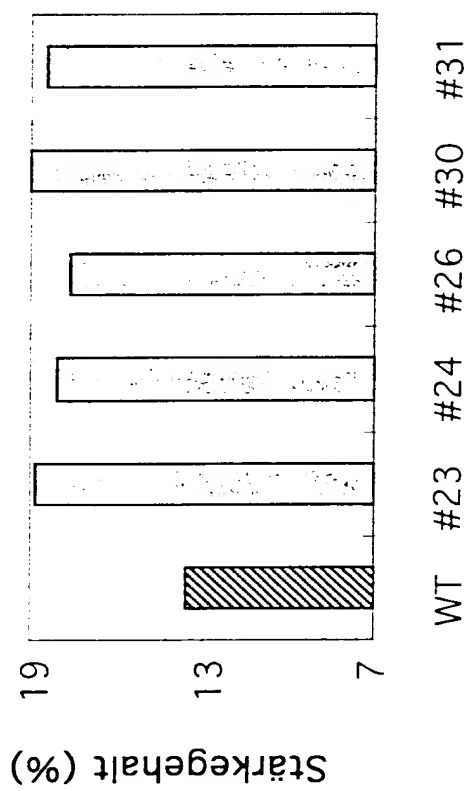




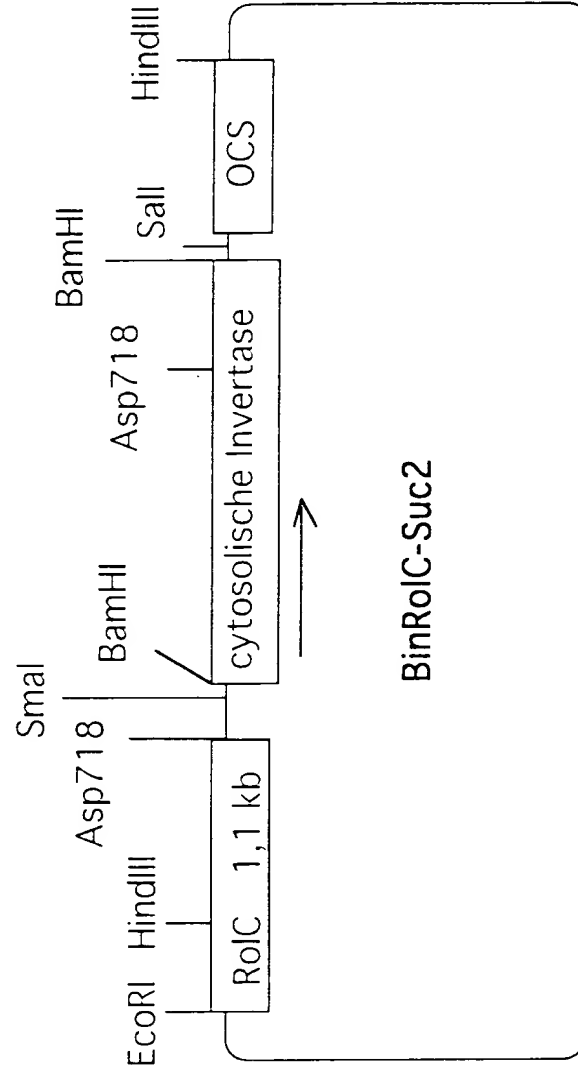
Figur 2a



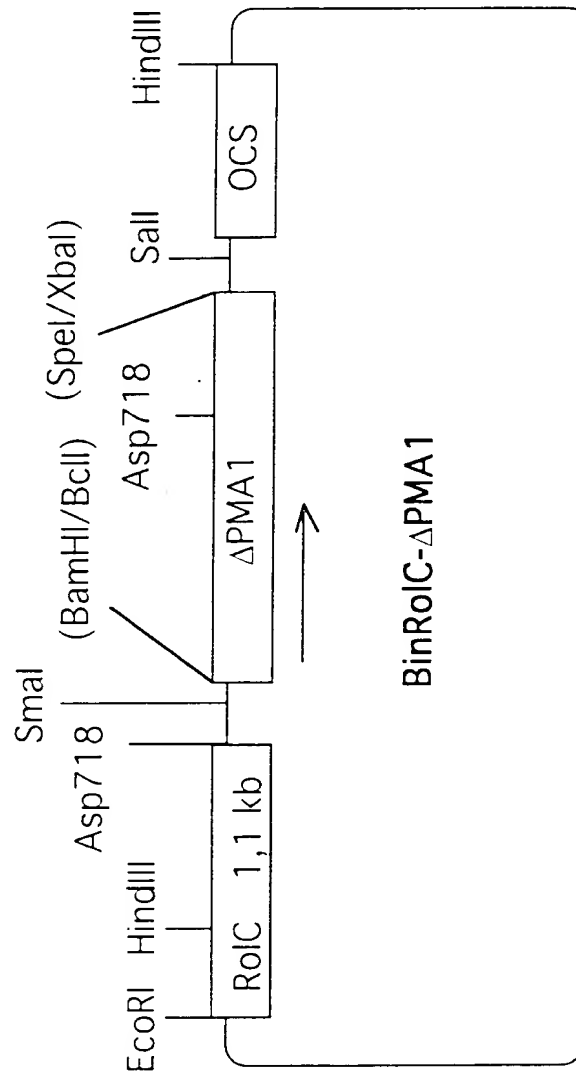
Figur 2b



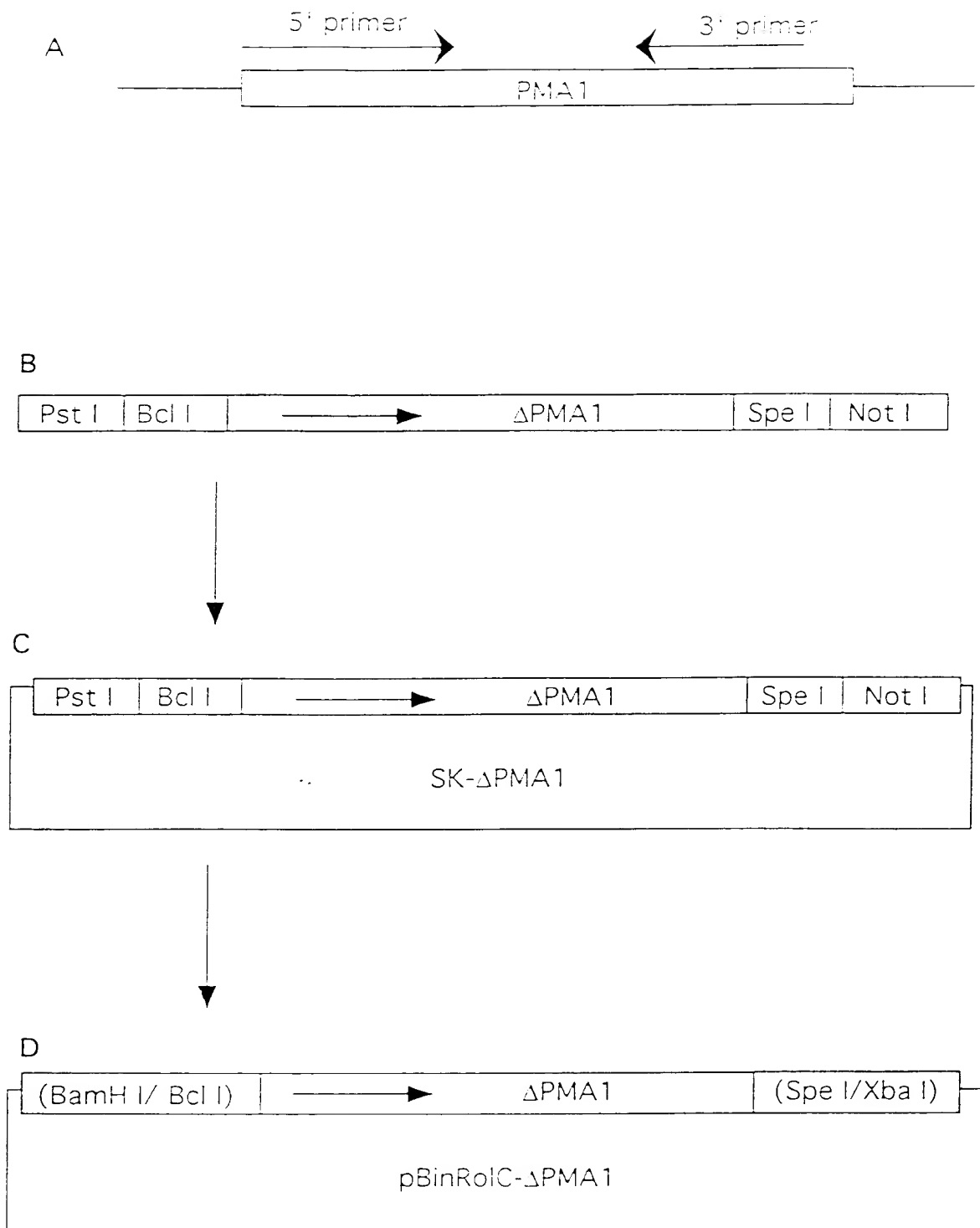
Figur 2c



Figur 3

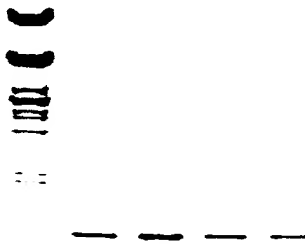


Figur 4

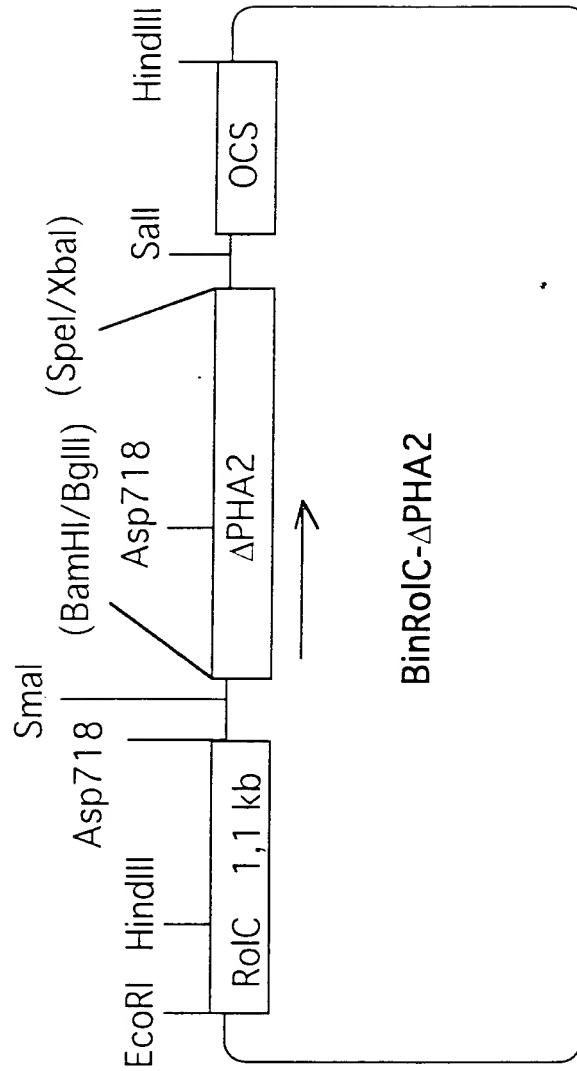


Figur 5

M    #5   #7   #18   #19   #20   WT

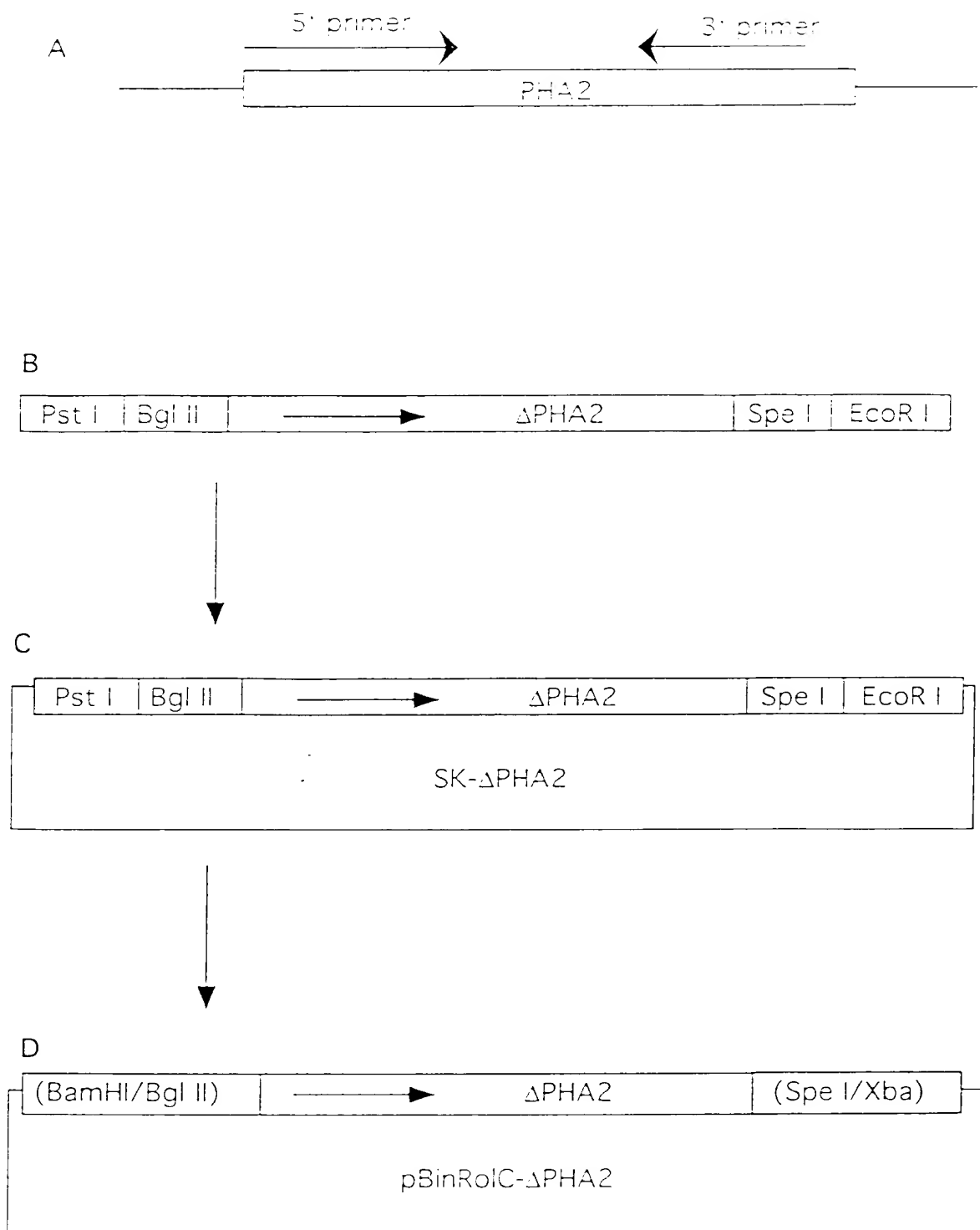


Figur 6



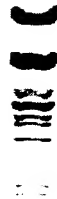
Figur 7



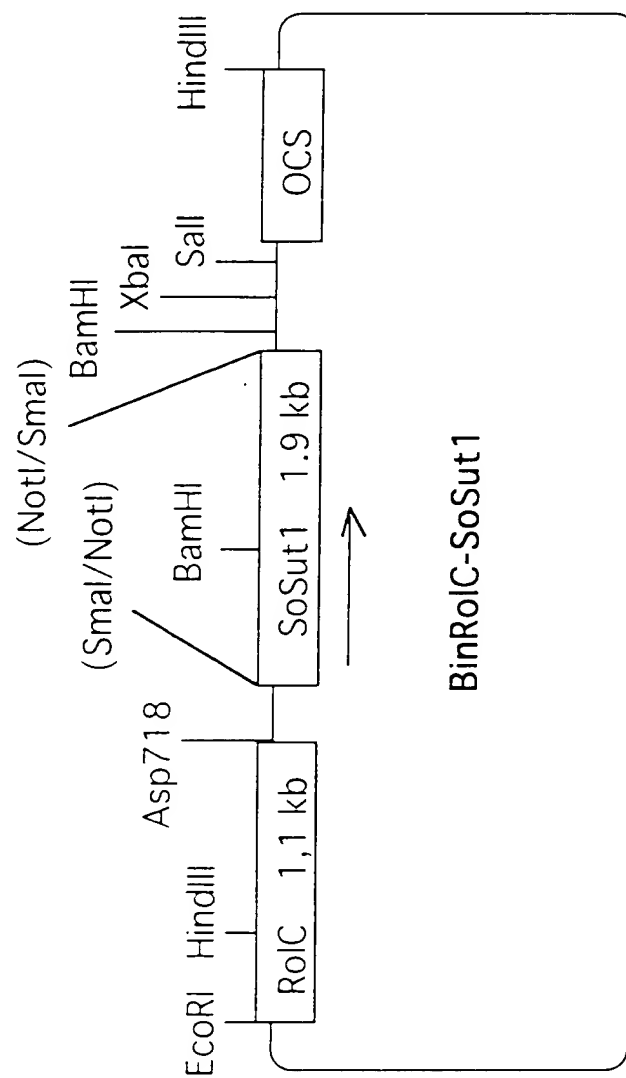


Figur 8

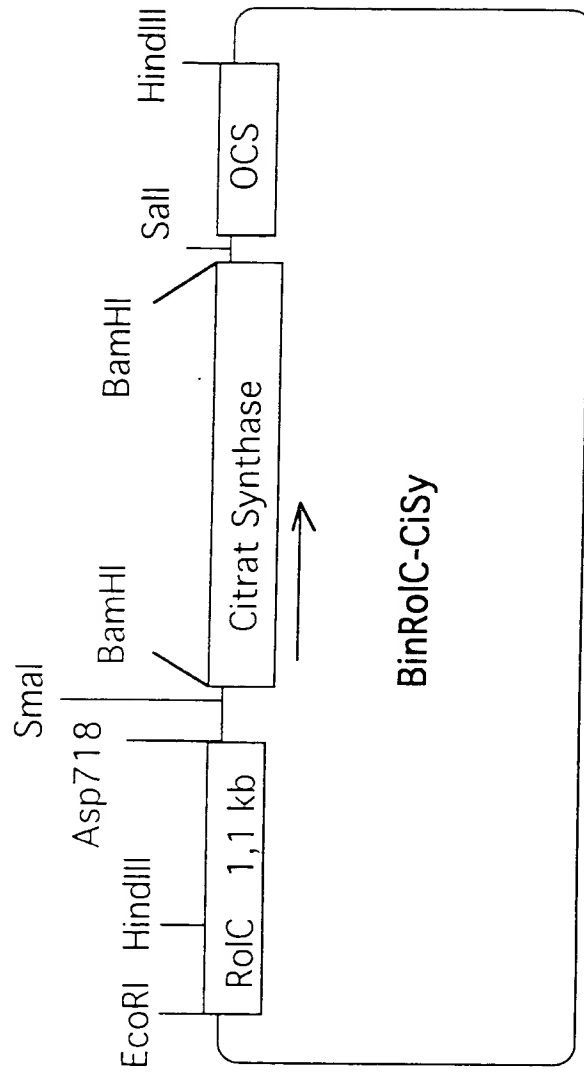
#3 #5 #9 #11 #26 WT M



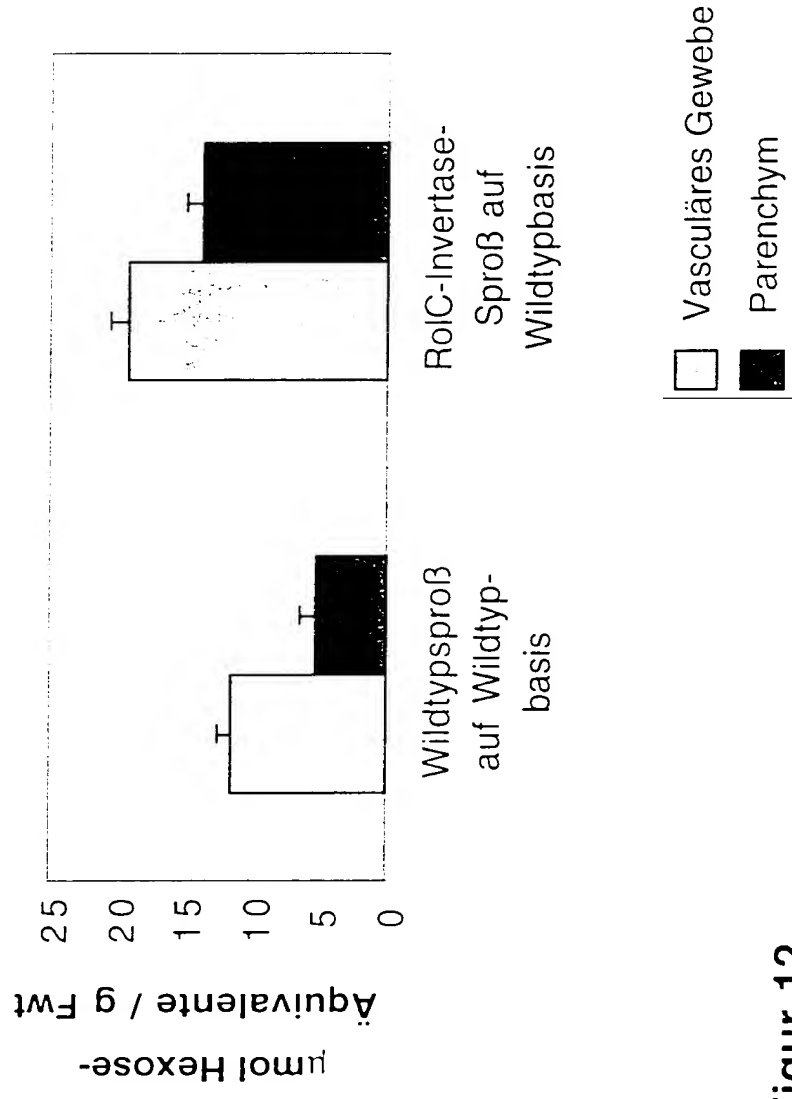
Figur 9



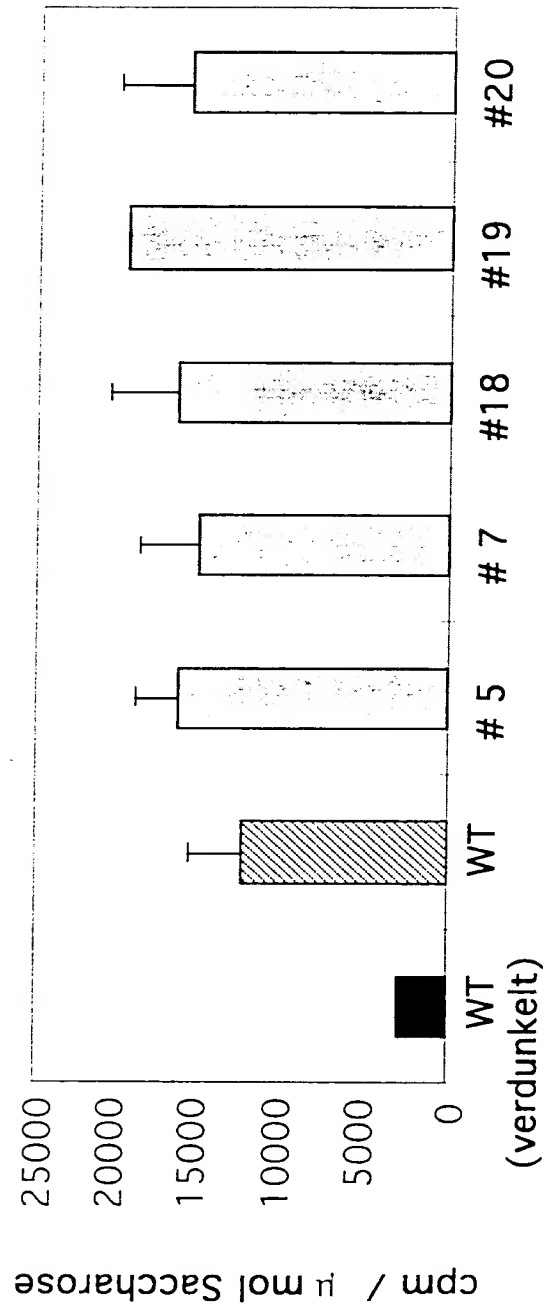
Figur 10



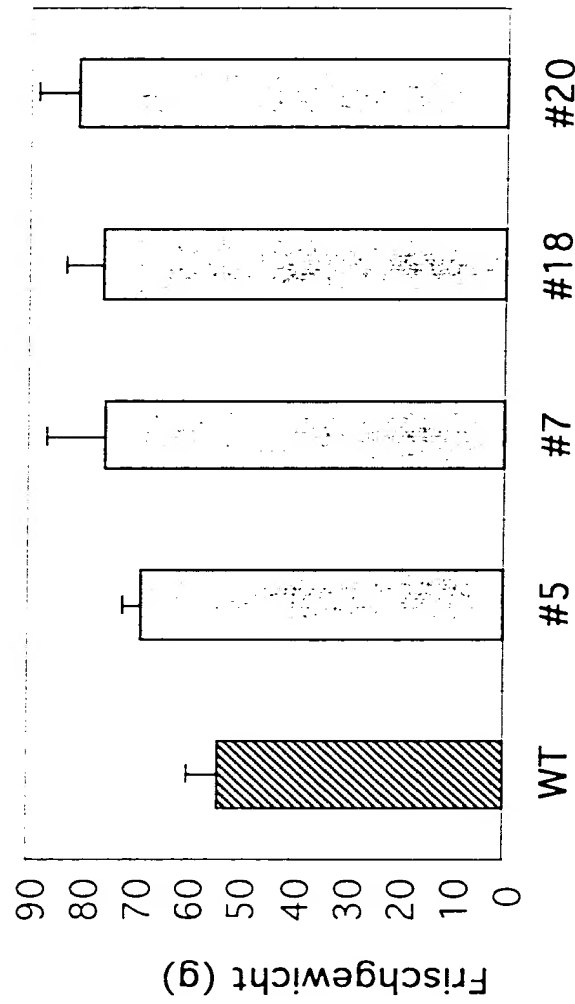
Figur 11



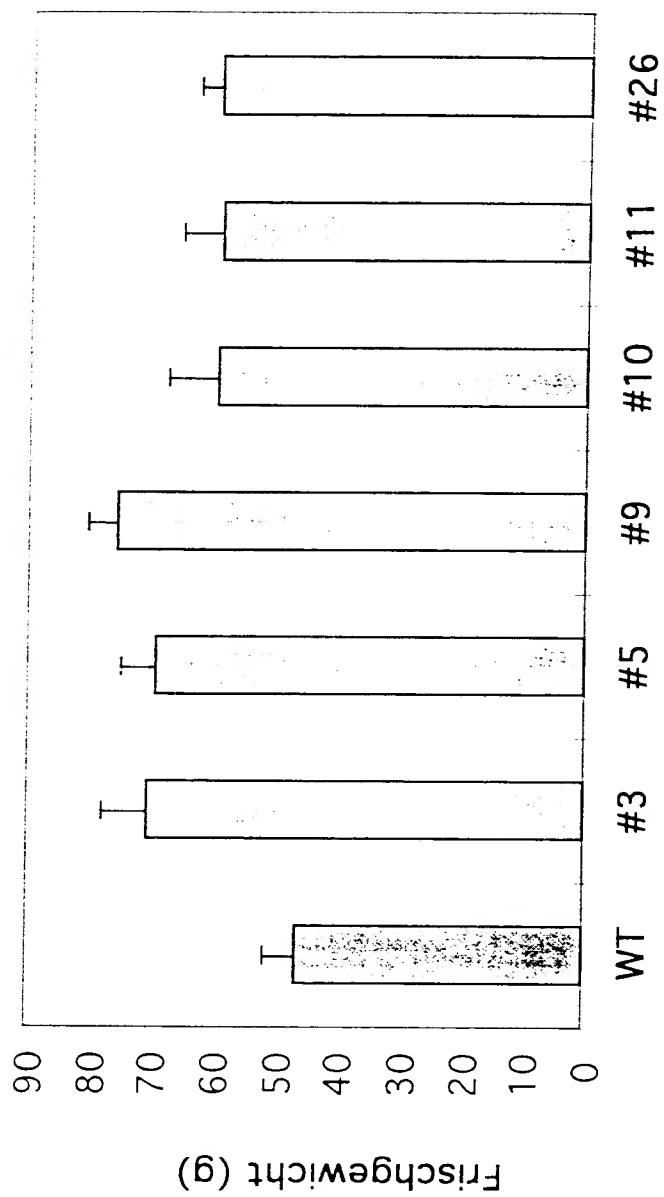
Figur 12



Figur 13



Figur 14



Figur 15